绒山羊羔羊和成年羊前体脂肪细胞的原代培养及传代方法

张清月　王　雪　刘树林　于　洋　郭晓宇　闫素梅*

（内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特　010018）

摘　要：本试验主要探索绒山羊羔羊和成年羊前体脂肪细胞的培养及传代方法，为研究绒山羊的脂肪代谢机理提供细胞模型。以3月龄阿尔巴斯白绒山羊羔羊肾周脂肪组织为试验材料，采用胶原酶法直接得到羔羊前体脂肪细胞，结合其细胞形态观察、生长曲线和油红O染色进行鉴定；以绒山羊成年羊肾周脂肪组织为试验材料，采用胶原酶法和“天花板”法得到成熟脂肪细胞后，通过去分化得到前体脂肪细胞，诱导分化后利用油红O染色鉴定其向成熟脂肪细胞分化的情况。绒山羊羔羊肾周脂肪组织中前体脂肪细胞的适宜分离条件为0.1% I型胶原酶、37 ℃消化1 h，250×*g*离心10 min；传代时分离细胞采用0.25%胰蛋白酶消化60 s。细胞形态为梭形，生长曲线呈“S”型，油红O染色结果呈阳性。成年羊采用和羔羊相同的胶原酶法获得成熟脂肪细胞后，通过改进的“天花板”法获得前体脂肪细胞，经诱导分化后，油红O染色结果呈阳性。综上，采用I型胶原酶消化法可直接分离培养3月龄绒山羊羔羊的前体脂肪细胞；采用胶原酶法和改进后的“天花板”法分离培养成年绒山羊的前体脂肪细胞是可行的。

关键词：绒山羊成年羊；绒山羊羔羊；前体脂肪细胞；细胞培养

中图分类号：S827　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

脂肪细胞内的脂肪酸代谢与羊肉风味密切相关。脂肪细胞是由前体脂肪细胞分化而来的，且该过程涉及一系列决定脂肪细胞形成的转录因子，所以前体脂肪细胞是研究动物脂肪代谢机理的理想模型。体外培养前体脂肪细胞，可重现脂肪细胞的发生、增殖和分化的全过程，也便于观察各种因素对细胞的影响，可用于探讨脂肪形成机理，研究对脂肪形成有效调控的方法。目前，国内利用胶原酶法已建立起牛[1]、绵羊[2]、猪[3]和绒山羊[4]等多种动物的前体脂

收稿日期：2018-02-27

基金项目：国家自然科学基金（31760685）

作者简介：张清月(1993—)，女，河南新乡人，硕士研究生，从事反刍动物营养的研究。E-mail：alicezqy@126.com

*通信作者：闫素梅，教授，博士生导师，E-mail：yansmimau@ 163.com

肪细胞培养模型，但普遍来源于幼龄动物。脂肪细胞的数量在生命早期就已基本确定[5]，随着动物年龄的增长，前体脂肪细胞逐渐分化为脂肪细胞，所以利用胶原酶消化直接得到动物前体脂肪细胞只适用于胚胎和幼龄动物，这使得利用前体脂肪细胞模型进行脂肪代谢的机理研究受到了动物年龄的限制，因此，研究成年动物前体脂肪细胞的分离与培养方法是非常必要的。目前，成年动物的前体脂肪细胞主要是利用“天花板”法培养成熟脂肪细胞后再去分化获得。成熟脂肪细胞的去分化是一个以脂解为主并伴有一定水平成脂的脂质代谢过程[6]。在成熟脂肪细胞积聚的过程中，其脂肪酸代谢和脂滴代谢受基因调控最终致使脂滴消失[7]，并通过自分泌和旁分泌途径刺激脂肪细胞分解，尤其是降低脂蛋白酯酶的生成及活性，阻止前体脂肪细胞分化，诱导成熟脂肪细胞逆分化，以促成脂肪细胞的去分化[8]。但目前对于“天花板”法的研究主要集中于人[8]、鼠[9]、猪[10]、牛[11]和兔[12]等动物，而利用此法从成年绒山羊的脂肪组织中分离培养得到前体脂肪细胞的研究报道甚少。而且，传统“天花板”法使用培养瓶，需要大量的培养基，且对起始细胞接种量要求较高，尽管有研究通过将培养皿和盖玻片结合而对传统方法做出了改进，但圆形盖玻片取材困难，且在切割过程中很难避免污染，仍在一定程度上使得研究工作受阻[13]。鉴于此，本论文旨在以阿尔巴斯白绒山羊的 3 月龄羔羊及成年羊肾周脂肪组织为试验材料，探索绒山羊羔羊和成年羊前体脂肪细胞的培养与传代方法，并对使用培养皿的“天花板”法做出改进，为通过前体脂肪细胞深入开展绒山羊脂肪代谢机理的研究提供基础，对绒山羊脂肪代谢的调节和羊肉品质的改善具有重要的理论与实际意义。

1　材料与方法

1.1　试验动物与主要试剂仪器

试验动物：3 月龄阿尔巴斯白绒山羊羔羊和阿尔巴斯白绒山羊成年母羊。

主要试剂：DMEM/F12 培养基、0.25%胰蛋白酶、青链霉素双抗和胰岛素转铁蛋白硒（ITS）均购自美国 Gibco 公司；I型胶原酶、地塞米松（配制 1 mg/mL 工作液）、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤（IBMX，配制 100 mg/mL 工作液）、二甲基亚砜(DMSO)、两性霉素 B（配制 2.5 mg/mL 工作液）和油红 O 均购自美国 Sigma 公司；磷酸盐缓冲液（PBS）和胎牛血清（FBS）购自美国 Hyclone 公司，其他试剂均为分析纯。

主要仪器：离心机、倒置显微镜、超净工作台、37 ℃ CO_2 培养箱、37 ℃恒温水浴锅、

37 ℃恒温摇床、25 cm^2 Corning 细胞培养瓶、35 mm Corning 细胞培养皿。

1.2　试验方法

1.2.1　羔羊前体脂肪细胞的原代与传代培养

羔羊前体脂肪细胞的分离与原代培养：试验采用I型胶原酶法分离获得前体脂肪细胞。采集阿尔巴斯白绒山羊羔羊肾周脂肪组织，用 75%酒精浸泡 30 s 后立刻放入含有双抗的 PBS 中。超净台内用含双抗的 PBS 冲洗数次，剔除可见血管和结缔组织，剪成约 0.5～1.0 mm 的脂肪小块，转移至无菌广口玻璃瓶内，加入 0.1%的I型胶原酶（$V_{脂肪小块}$:$V_{胶原酶}$=1:3），在 37 ℃恒温摇床内消化 1 h，消化液经 200 目细胞筛过滤，滤液于 250×*g* 离心 10 min。弃去所得上清液，沉淀用基础培养基（含 DMEM/F12 培养基 15.6 g/L 和碳酸氢钠 1.2 g/L）制成细胞悬液，于 250×g 离心 10 min，弃去上清液，重复上步离心步骤后，将沉淀重悬于 5 mL 完全培养基（含 25% FBS、2.5%双抗和 0.25%两性霉素 B 工作液），并接种于 25 cm^2 培养瓶内，于 37 ℃、5% CO_2 培养，每 2 天换 1 次液。

羔羊前体脂肪细胞的传代培养：原代细胞培养至 80％～90％汇合时（约第 5 天），弃去培养液，PBS 冲洗 2 次，每培养瓶加入 2 mL 0.25％胰蛋白酶消化液。显微镜下观察大部分细胞回缩成圆点状并有细胞飘起时，加入 3 mL 完全培养基终止消化。收集细胞悬液，250×*g* 离心 10 min，弃上清，PBS 冲洗后，用 5 mL 完全培养基重悬细胞，按 1:3 的比例进行传代（即 F1 代）接种培养，置于 37 ℃、5％ CO_2 培养箱中，每 2 天换液 1 次，直至细胞汇合并铺满整个培养瓶（约第 7 天）再传第 2 代（即 F2 代）。

1.2.2　成年羊前体脂肪细胞的原代与传代培养

成年羊前体脂肪细胞的分离与原代培养：试验采用I型胶原酶消化法与改进后的"天花板"法分离培养得到成熟脂肪细胞后，利用去分化的方法得到前体脂肪细胞。采集阿尔巴斯白绒山羊成年羊肾周脂肪组织，用 75%酒精浸泡 30 s 后立刻放入含有双抗的 PBS 中，用和羔羊脂肪组织相同的方法进行 PBS 冲洗、剪碎、消化、过滤和离心。离心后，取上清（脂肪细胞悬浮于上清中），与等体积基础培养基混匀，取 1 mL 接种于 35 mm 无菌培养皿，注满完全培养基至将要溢出时，改进原有培养方法，将配套培养皿的皿盖倒置滑动地覆盖在皿上，以避免气泡产生，从而借助液体表面张力使皿盖与皿牢牢吸住，确保密闭环境。将其翻转，37 ℃、5% CO_2 培养，成熟脂肪细胞由于受浮力作用将漂浮到"天花板"面生长。随后每 2 天

换 1 次液，成熟脂肪细胞再次进入细胞周期，逐渐吐出胞内脂滴，7 d 后基本去分化为梭形，可贴壁生长，将培养皿正立，正常培养，至脂滴完全消失且细胞去分化为具有成纤维细胞形态的前体脂肪细胞为止。

成年羊前体脂肪细胞的传代培养与前述的羔羊前体脂肪细胞传代培养相同。

1.2.3　羔羊前体脂肪细胞生长曲线的绘制

参考司徒镇强等[14]的方法，用血细胞计数板对羔羊前体脂肪细胞进行计数。取羔羊原代前体脂肪细胞，待细胞汇合度达 80%时，传代并接种至 35 mm 培养皿，随机分为 8 组，每组 3 个重复，每 2 天对每个培养皿的细胞进行计数，取平均值，至第 14 天为止。按公式计算前体脂肪细胞的倍增时间：$DT = t \times \lg 2/(\lg N_t - \lg N_0)$。式中：$DT$ 为细胞倍增时间；t 为培养时间；N_0 为首次计数获得的细胞数；N_t 为培养 t 时间后的细胞数。

1.2.4　羔羊和成年羊前体脂肪细胞的鉴定

将 F2 代前体脂肪细胞诱导分化为脂肪细胞后进行油红 O 染色，鉴定培养得到的细胞是否为前体脂肪细胞。

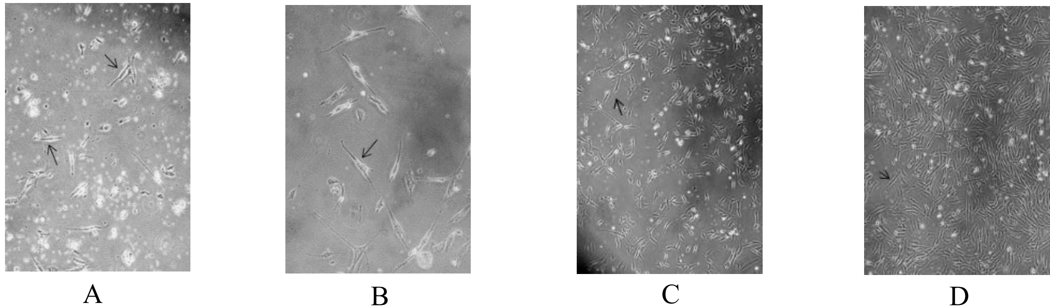
羔羊及成年羊前体脂肪细胞的诱导分化：将 F2 代细胞培养至 80%～90%汇合时，换用诱导培养基（含 10% FBS、0.04%地塞米松工作液、0.011% IBMX 工作液、0.5% ITS、2%双抗和 0.2%两性霉素 B 工作液）培养 2 d，再换胰岛素培养基（含 10% FBS、0.5% ITS、4%双抗和 0.4%两性霉素 B 工作液）培养 2 d，最后换完全培养基继续培养，每 2 天换液 1 次，直至 80%的细胞出现脂滴。

羔羊及成年羊前体脂肪细胞的鉴定：采用油红 O 染色法对脂肪细胞进行分化鉴定。羔羊前体脂肪细胞及成年羊去分化得到的前体脂肪细胞经诱导成熟后，弃去完全培养基，用 PBS 漂洗 2 次。用 4%多聚甲醛固定 30 min，PBS 漂洗 2 次，油红 O（1%油红 O 溶于异丙醇，蒸馏水稀释 1.67 倍）染色 1 h，弃染色液，用蒸馏水漂洗数次后，于倒置显微镜下观察。

2　结　果

2.1　原代培养的羔羊前体脂肪细胞形态学观察

前体脂肪细胞培养2 d时，大部分为短梭形或不规则三角形，伸展状态较明显(图1A)。随着培养时间延长，第3、4天贴壁细胞体积更大，更加伸展，纤维状更加明显(图1B、图1C)。之后细胞开始迅速增殖，密度明显增大，甚至出现重叠生长，细胞发生接触抑制和密度抑制，大量汇合后生长停止，其中有的细胞出现自分化，分化的细胞开始沉积脂肪颗粒，胞内出现很多小脂滴（图1D）。



A.原代培养第 2 天的细胞；B.原代培养第 3 天的细胞；C.原代培养第 4 天的细胞；D.原代培养第 5 天的细胞

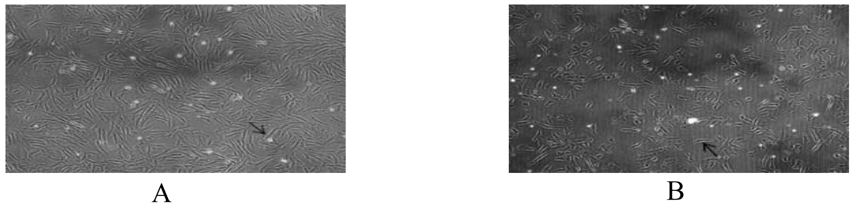
A. Cells on day 2 of primary culture (×200); B. Cells on day 3 of primary culture (×200); C. Cells on day 4 of primary culture (×100); D. Cells on day 5 of primary culture (×100)

图 1　原代培养羔羊前体脂肪细胞形态学观察

Fig. 1　Morphological observation of primary cultured preadipocytes of lambs

2.2　传代培养的羔羊前体脂肪细胞形态学观察

F1代和F2代细胞与原代细胞形态特征很相似，呈纤维状。稍有不同即F1代和F2代细胞成分更均一，形态更一致，生长更旺盛，抗污染性更强，不易受杂菌污染，自分化现象减少（图2A、图2B）。



A. F1 代培养第 2 天的细胞；B. F2 代培养 4 h 的细胞

A. Cells of F1 on day 2 of culture (×100); B. Cells of F2 at 4 h of culture (×100)

图 2　传代培养羔羊前体脂肪细胞形态学观察

Fig. 2　Morphological observation of passaged cultured preadipocytes of lambs

2.3　羔羊前体脂肪细胞生长曲线

如图 3 所示，羔羊前体脂肪细胞的生长曲线呈“S”型，接种 4 d 内细胞处于停滞期，生长缓慢，4 d 后细胞生长速度加快进入对数生长期，12 d 后脂肪细胞生长进入平台期，计算

所得前体脂肪细胞的倍增时间为 6.9 d。

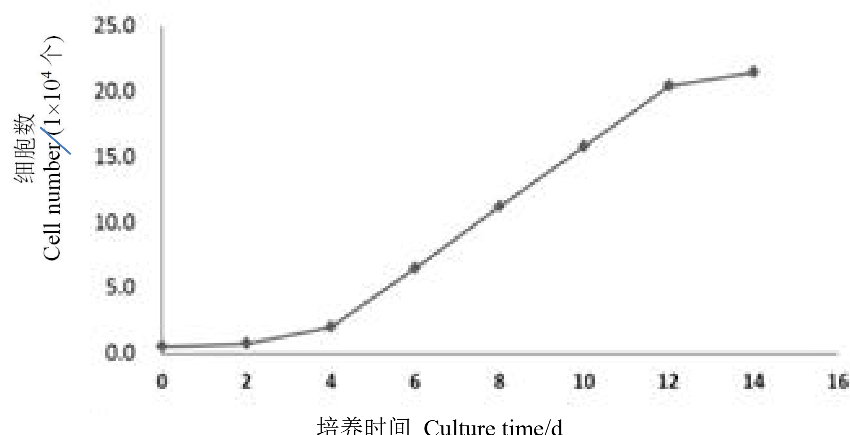


图 3　羔羊前体脂肪细胞的生长曲线

Fig. 3　Growth curve of preadipocytes of lambs

2.4　羔羊前体脂肪细胞的诱导、分化及鉴定

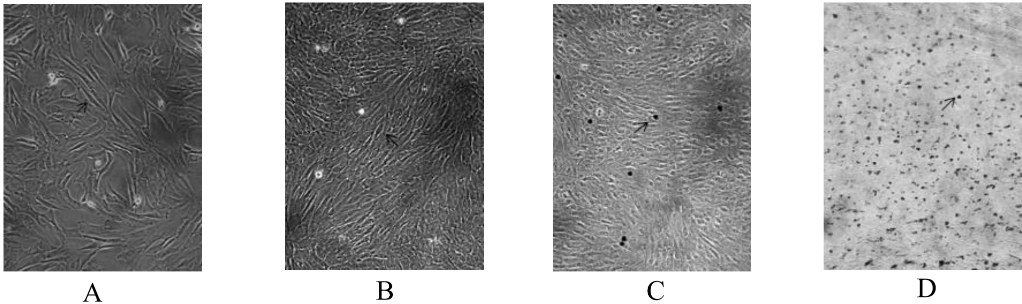
将经过传代培养的 F2 代细胞进行诱导分化培养，可在镜下观察到其依次经历分化准备期、分化启动期、快速分化期和分化成熟期，最后分化为脂肪细胞。

分化准备期：将汇合度达 90%的 F2 代细胞再培养 2 d（记为分化第 2 天），以使细胞从生长周期中退出，为下一步分化作好准备（图 4A）。

分化启动期：换用诱导培养液诱导 2 d（记为分化第 4 天），此时细胞在诱导剂的诱导下，进入分化启动期，纤维状更加明显（图 4B）。

快速分化期：再换用胰岛素分化培养液培养 2 d（记为分化第 6 天），细胞迅速进入分化状态，胞质内开始出现小脂滴，但数量较少。

分化成熟期：换用完全培养基继续培养 2 d（记为分化第 8 天），胞内脂滴更加明显，油红 O 染色呈阳性并能看到标志性“指环”（图 4C）。分化第 10 天胞内脂滴变多且体积变大，脂滴融合，占据细胞大部分体积。有些脂滴分泌到培养液中，使培养液变粘稠。部分细胞脱落，浮于培养液内。油红 O 染色鉴定后，脂滴被染成红色（图 4D），说明这些细胞是脂肪细胞，分化之前的细胞为前体脂肪细胞。经过观察，从前体脂肪细胞生长为成熟的脂肪细胞约需 10 d。



A. F2 代分化第 2 天的细胞；B. F2 代分化第 4 天的细胞；C. F2 代分化第 8 天油红 O 鉴定； D. F2 代分化第 10 天油红 O 鉴定

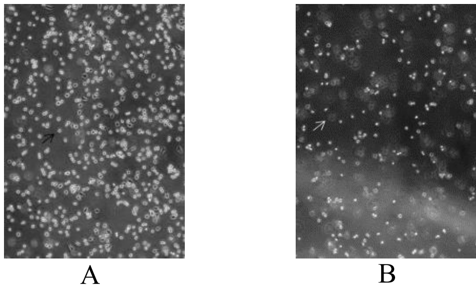
A. Cells of F2 on day 2 of differentiation (×200); B. Cells of F2 on day 4 of differentiation (×200); C. Cells of F2 on day 8 of differentiation, stained by oil red O (×200); D. Cells of F2 on day 10 of differentiation, stained by oil red O (×100)

图 4　羔羊前体脂肪细胞诱导、分化及鉴定形态学观察

Fig. 4　Morphological observation of inducement, differentiation and identification of preadipocytes of lambs

2.5　羔羊前体脂肪细胞胰酶消化形态学观察

不同组织或细胞对胰酶作用的反应是不一样的，且消化时间越久对细胞损伤越大。绒山羊羔羊前体脂肪细胞消化 60 s 时，镜下观察可见大多数细胞成圆点（图 5A），说明细胞已被消化下来；消化 90 s 时细胞漂浮（图 5B），说明消化时间略长，可能已对细胞造成损伤。因此，我们筛选出的适宜消化时间为 60 s。



A.前体脂肪细胞胰酶消化 60 s；B.前体脂肪细胞胰酶消化 90 s

A. Preadipocytes trypsinized for 60 s (×100); B. Preadipocytes trypsinized for 90 s (×100)

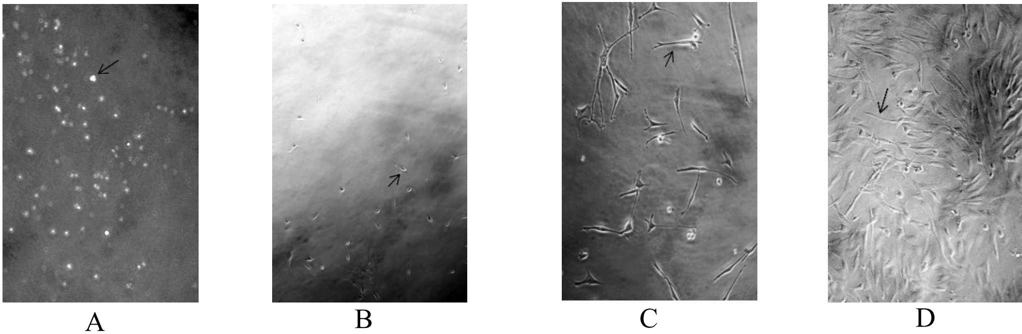
图 5　羔羊前体脂肪细胞胰酶消化形态学观察

Fig. 5　Morphological observation of trypsin digestion of preadipocytes of lambs

2.6　成年羊成熟脂肪细胞的分离培养与去分化

利用胶原酶法从成年羊肾周脂肪组织上获得的脂肪细胞培养第2天时，镜下观察发现，成熟脂肪细胞漂浮到倒置培养皿的“天花板”层，贴壁生长细胞为单室脂滴成熟脂肪细胞形态，并观察到正在分裂的脂肪细胞(图6A)；培养第5天时，细胞开始成梭型(图6B)；随着天数的增加，梭型细胞逐渐增多，还可观察到细胞正在“吐”出脂滴(图6C)，第14天时细胞中脂滴完

全消失，去分化为具有成纤维细胞形态(图6D)的前体脂肪细胞。



A.成熟脂肪细胞培养第 2 天；B.成熟脂肪细胞培养第 5 天；C.成熟脂肪细胞培养第 7 天；D.成熟脂肪细胞培养第 14 天

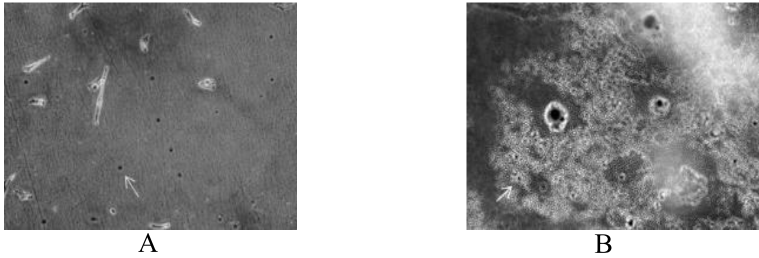
A. Mature adipocytes on day 2 of culture (×100); B. Mature adipocytes on day 5 of culture (×100); C. Mature adipocytes on day 7 of culture (×200); D. Mature adipocytes on day 14 of culture (×200)

图 6　成年羊成熟脂肪细胞的增殖与去分化形态学观察

Fig. 6　Morphological observation of proliferation and dedifferentiation of mature adipocytes of adult goats

2.7　成年羊前体脂肪细胞的诱导分化与鉴定

随着 F2 代前体脂肪细胞的分化，被油红 O 染色的细胞逐渐增多（图 7A），在分化第 12 天时，90%以上的细胞油红 O 染色呈阳性（图 7B），说明分化后形成的细胞是脂肪细胞，故用本法培养出的细胞为前体脂肪细胞。



A.前体脂肪细胞诱导第 6 天油红 O 鉴定；B.成熟脂肪细胞培养第 12 天油红 O 鉴定

A. Preadipocytes on day 6 of inducement, stained with oil red O (×200); B. Mature adipocytes on day 12 of culture, stained with oil red O (×100)

图 7　成年羊前体脂肪细胞诱导分化和鉴定形态学观察

Fig. 7　Morphological observation of induced differentiation and identification of preadipocytes of adult goats

3　讨　论

胶原酶消化法是一种分离细胞的基本方法。胶原酶是从细菌中提取出来的，对胶原和胞间质有较好的消化作用且对细胞本身影响较小，可使细胞脱离胶原成分而不受伤害。前体脂肪细胞可来源于不同的脂肪组织，利用胶原酶消化法国内外已建立了多种动物的前体脂肪细

胞培养模型，但均来源于幼龄动物。如蔡勇等[2]从1日龄绵羊的肾周脂肪组织获得前体脂肪细胞；且来源于1日龄绒山羊肌内脂肪组织[4]、60日龄猪皮下脂肪组织[3]、1日龄猪皮下脂肪组织[15]、20日龄鼠腹股沟和附睾脂肪组织[16]、新生牛腹股沟和肾周脂肪组织[1]以及7日龄猪颈部和背部皮下脂肪组织[17]的前体脂肪细胞也已通过胶原酶法获得，利用油红O染色法可将脂滴染成红色，且脂滴边界出现透明“指环”结构，该法可简便快捷地测定体外培养前体脂肪细胞的转化率，Ramirez-Zacarias等[18]报道其敏感性和准确性同前体脂肪细胞分化过程中的标志酶甘油磷酸脱氢酶相似，常用于体外前体脂肪细胞的鉴定。因此，本研究采用该方法鉴定前脂肪细胞向脂肪细胞的分化情况，结果得出，以3月龄的羔羊肾周脂肪组织为材料获得的前体脂肪细胞形态为梭形，其生长曲线呈“S”型，与成纤维细胞的生长曲线相似，经传代后（F2代）进行诱导分化，利用油红O染色发现，在分化第8天出现了标志性指环；分化第10天脂滴变大并融合，且油红O染色结果为阳性；符合由Ng等[19]和Van等[20]提出的前体脂肪细胞的鉴定标准，这说明利用此法获得绒山羊羔羊的前体脂肪细胞是可行的，这为从细胞生物学层面研究绒山羊脂肪代谢提供了重要模型。此外，本试验使用的前体脂肪细胞诱导分化剂是经典的激素鸡尾酒，由胰岛素、地塞米松和IBMX组成，国内外已有许多报道[21-22]使用该诱导剂成功诱导前体脂肪细胞分化为脂肪细胞。但有报道显示，脂肪组织中的间充质干细胞也能分化为脂肪细胞，其功能与前体脂肪细胞类似[23]，本试验所获细胞中或含有少量间充质干细胞，因此，在前体脂肪细胞的纯化以及与间充质干细胞的鉴别等方面有待开展进一步的研究。

脂肪细胞的数量在生命早期就已基本确定[5]，随着动物年龄的增长，前体脂肪细胞逐渐分化为脂肪细胞，所以利用胶原酶法直接得到的动物前体脂肪细胞只适用于胚胎和幼龄动物，这使成年动物脂肪代谢的机理研究受到了动物年龄的限制。因此，采用成年动物的成熟脂肪细胞去分化法得到前体脂肪细胞非常必要，“天花板”法是目前最为常用的方法。成熟脂肪细胞在积聚后会自动发生去分化形成前体脂肪细胞[6]，且可通过自分泌和旁分泌途径刺激脂肪细胞分解，阻止前体脂肪细胞分化，诱导成熟的脂肪细胞逆分化，以促进脂肪细胞去分化[8]。陈晓炜等[8]用胶原酶分离 30~35 岁女性腹脂的成熟脂肪细胞并利用“天花板”法去分化为前体脂肪细胞；此外，源于平均年龄 48.5 岁的人眼眶脂肪[24]、12 周龄鼠皮下脂肪[16]以及 4 月龄兔腹股沟脂肪[19]的成熟脂肪细胞也可通过“天花板”法去分化获得前体脂肪细胞。本试验以成

年绒山羊肾周脂肪组织为试验材料，采用与羔羊相同的胶原酶消化法结合“天花板”法分离培养得到成熟脂肪细胞后，通过去分化的方法获得前体脂肪细胞，再将前体脂肪细胞进行诱导分化得到脂肪细胞。研究发现原代脂肪细胞培养 2 d 时开始贴“天花板”层生长，第 5 天时开始呈现梭形，培养 14 d 时完全去分化为前体脂肪细胞。在此基础上传代、诱导分化后，F2 代细胞在分化第 12 天时 90%以上的细胞油红 O 染色呈阳性，说明成熟的脂肪细胞已被诱导分化为前体脂肪细胞，因此采用“天花板”法获得绒山羊成年羊的前体脂肪细胞是可行的。与利用胶原酶消化法直接分离培养前体脂肪细胞相比，该法获得的前体脂肪细胞尽管也有成本相对较高、培养周期长的缺点，但其纯度高，分化能力强且不受动物年龄限制，为研究脂肪细胞的分化与代谢提供了新模型。此外，传统“天花板”法需使用培养瓶，大量耗费培养液，且对起始细胞接种量要求较高。Wei 等[11]使用多个培养皿套用的方法进行培养，仍较耗费培养基。因此，本研究在已有的脂肪细胞“天花板”培养法的基础上，将培养瓶培养改进为培养皿盖倒置培养，获得了前体脂肪细胞，不仅节约了培养基、降低了培养成本，且简便易行，保证了培养的密闭环境。

4 结 论

①以 3 月龄阿尔巴斯白绒山羊羔羊肾周脂肪组织为试验材料，采用 I 型胶原酶消化法直接获得羔羊前体脂肪细胞。

②以阿尔巴斯白绒山羊成年母羊肾周脂肪组织为试验材料，采用胶原酶消化法和“天花板”培养法得到成熟脂肪细胞后，再利用去分化得到成年绒山羊的前体脂肪细胞是可行的，这为探讨绒山羊的脂肪代谢机理提供了细胞模型。

参考文献：

[1] 郭红芳,昝林森,孙永刚.牛前体脂肪细胞的分离培养及诱导分化[J].西北农林科技大学学报,2014,42(2):1–6,12.

[2] 蔡勇,阿依木古丽,杨具田,等.绵羊前体脂肪细胞的原代培养及分化[J].动物营养学报,2010,22(6):1768–1774.

[3] 李影,杨公社,卢荣华,等.原代猪前体脂肪细胞培养方法的优化[J].细胞生物学杂志,2005,27(6):697–700.

[4] 杜琛,付绍印,韩志玲,等.绒山羊肌内前体脂肪细胞的基因表达分析[J].畜牧兽医学报,2013,44(10):1532–1538.

[5] SPALDING K L,ARNER E,WESTERMARK P O,et al.Dynamics of fat cell turnover in humans[J].Nature,2008,453(7196):783–787.

[6] 李翼飞,王兆杰.脂肪细胞去分化过程中脂滴丢失的调控机制研究进展[J].西部医学,2015,27(8):1271–1274.

[7] 何衡杰,郝丽.肿瘤坏死因子α在超重者脂肪组织中的表达[J].中国卫生产业,2014,23(11):13–14,17.

[8] 陈晓炜,姜平,高建华,等.脂肪细胞去分化及构建组织工程化脂肪的实验研究[J].南方医科大学学报,2009,29(4):606–610.

[9] NAKAYAMA E,MATSUMOTO T,KAZAMA T,et al.Transplantation of dedifferentiation fat cells promotes intervertebral disc regeneration in a rat intervertebral disc degeneration model[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2017,493(2):1004–1009.

[10] 王欢欢,孙文星,徐春瑛,等.猪成熟脂肪细胞分离培养及去分化研究[J].农业生物技术学报,2012,20(8):915–921.

[11] WEI S J,DU M,JIANG Z H,et al.Bovine dedifferentiated adipose tissue (DFAT) cells:DFAT cell isolation[J].Adipocyte,2013,2(3):148–159.

[12] 吴迪.去分化脂肪细胞与脂肪干细胞成骨及成软骨能力的比较研究[D].硕士学位论文.遵义:遵义医学院,2012.

[13] 宋子仪,史新娥,杨浩,等.基于一种新的天花板培养方法分析猪成熟脂肪细胞去分化过程中关键基因表达模式[J].农业生物技术学报,2013,21(4):379–387.

[14] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].2 版.西安:世界图书出版公司,2007.

[15] 胡艳霞,曾勇庆,崔志峰,等.莱芜猪前体脂肪细胞的原代培养及诱导分化研究[J].畜牧兽医学报,2012,43(9):1346–1352.

[16] 孙超.ECM组分和cAMP对大鼠前体脂肪细胞增殖与分化的调控[D].博士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2001.

[17] 屈长青,张国华,陈粉粉,等.猪前体脂肪细胞的原代培养[J].农业生物技术学报,2005,13(5):649–653.

[18] RAMÍREZ-ZACARÍAS J L,CASTRO-MUÑOZLEDO F,KURI-HARCUCH W.Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O[J].Histochemistry,1992,97(6):493–497.

[19] NG C G,POZNANSKI W J,BOROWIECKI M,et al.Differences in growth *in vitro* of adipose cells from normal and obese patients[J].Nature,1971,231(5303):445.

[20] VAN R L,BAYLISS C E,RONCARI D A.Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture[J].Journal of Clinical Investigation,1976,58(3):699–704.

[21] 张艳芳,任阳,朱琳娜,等.猪肌内前体脂肪细胞的体外培养[J].农业生物技术学报,2011,19(1):16–121.

[22] CHURCH C,BROWN M,RODEHEFFER M S.Conditional immortalization of primary adipocyte precursor cells[J].Adipocyte,2015,4(3):203–211.

[23] 闵敏,张雪静,马红,等.人脂肪间充质干细胞的原代培养及体外成骨成脂诱导分化[J].江苏大学学报（医学版）,2013,23(3):185–190.

[24] 杨柳,朱鸣阳,黑砚,等.人眼眶前脂肪细胞的培养和诱导分化及鉴定[J].医学研究生学报,2011,24(10):57–60.

Primary Culture and Passage Method of Preadipocytes of Cashmere Lambs and Adult Goats

ZHANG Qingyue WANG Xue LIU Shulin YU Yang GUO Xiaoyu YAN Sumei*

(*Collage of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: The study aimed to explore the primary culture and passage methods of preadipocytes of cashmere lambs and adult goats, and to provide a cell model for further researching the metabolic mechanism of adipocytes of cashmere goats. Perirenal adipose tissues of 3-month-old

Albas cashmere lambs were selected as test materials. Preadipocytes of lambs were obtained directly by collagenase digestion method, and identified by morphological observation, growth curve and oil red O staining; perirenal adipose tissues of cashmere adult goats were selected as test materials. Mature adipocytes of adult goats were obtained by collagenase digestion and “ceiling” culture methods, and then preadipocytes were obtained by the dedifferentiation of mature adipocytes. After induction of differentiation, oil red O staining was used to identify their differentiation into mature adipocytes. The appropriate separation conditions for preadipocytes of the perirenal adipose tissues of lambs were digestion by 0.1% I collagenase at 37 ℃ for 1 h, and centrifugation at 250×g for 10 min; during cell passage, digestion by 0.25% trypsin for 60 s. The preadipocytes were fusiform, grew in an “S” shape, and were positive on oil red O staining. Mature adipocytes of adult goats were obtained by collagenase digestion method in the same way as the lambs’ method, and then using modified “ceiling” method obtained preadipocytes. After induction of differentiation, those preadipocytes were positive on oil red O staining. In conclusion, it is feasible to obtain preadipocytes directly by type I collagenase digestion method from 3-month-old Albas cashmere lambs and by collagenase digestion and modified “ceiling” methods from adult cashmere goats.

Key words: cashmere adult goats; cashmere lames; preadipocytes; cell culture

---

*Corresponding author, professor, E-mail: yansmimau@163.com (责任编辑　陈　鑫)